

梯度洗脱HPLC法检查阿瑞匹坦原料药中的有关物质

于美芹^{1*}, 田兆兴¹, 刘宝枚¹, 罗兆亮²(1.日照市中医医院, 山东日照 276800; 2.河北大学药学院, 河北保定 071002)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)21-1992-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.21.24

摘要 目的:建立检查阿瑞匹坦原料药中有关物质的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Merck C₁₈;流动相A为0.2%磷酸溶液(pH 2.5),流动相B为乙腈,梯度洗脱;检测波长为215 nm。按照加校正因子主成分自身对照法进行定量计算。结果:起始原料I、起始原料II、中间体I、中间体II、阿瑞匹坦各峰之间均能达到很好的分离,并在各自的检测质量浓度范围内线性关系良好($r=0.999\ 0\sim 0.999\ 8$),检测限分别为0.01、0.06、0.01、0.25、0.03 μg/ml;各杂质平均回收率分别为99.43%、99.05%、98.85%、100.6%(RSD为0.29%、0.10%、0.64%、0.26%, $n=3$)。结论:本文建立的方法灵敏快速、准确可靠,可作为阿瑞匹坦原料药的有关物质检查方法。

关键词 阿瑞匹坦;高效液相色谱法;梯度洗脱;有关物质

Determination of Related Substances in Aprepitant Raw Material by Gradient Elution HPLC

YU Mei-qin¹, TIAN Zhao-xing¹, LIU Bao-mei¹, LUO Zhao-liang²(1.Rizhao Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shandong Rizhao 276800, China; 2.School of Pharmacy, Hebei University, Hebei Baoding 071002, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To establish a method for the determination of related substances in aprepitant raw material. **METHODS:** Gradient elution HPLC method was adopted. The analysis was performed on Merck C₁₈ column with mobile phase A composed of 0.2% phosphoric acid solution (pH 2.5) and mobile phase B consisted of acetonitrile (gradient elution). The detection wavelength was set at 215 nm. The related substances were determined by the self-control method with corrected factor. **RESULTS:** Starting material I, starting material II, intermediates I, intermediates II and aprepitant were completely separated from the main peak. The calibration curve of these related substances were in good linear relationship ($r=0.999\ 0\sim 0.999\ 8$), and the limits of detection were 0.01, 0.06, 0.01, 0.25 and 0.03 μg/ml, respectively. The average recoveries of the impurities mentioned above were 99.43% (RSD=0.29%, $n=3$), 99.05% (RSD=0.10%, $n=3$), 98.85% (RSD=0.64%, $n=3$) and 100.6% (RSD=0.26%, $n=3$), respectively. **CONCLUSIONS:** The developed method is sensitive, rapid, accurate and reliable, and can be used for the detection of related substances in aprepitant raw material.

KEYWORDS Aprepitant; HPLC; Gradient elution; Related substances

阿瑞匹坦是美国默克公司研发的神经激肽1(NK-1)受体拮抗药^[1], 2003年3月26日其胶囊剂经美国FDA批准上市, 商品名为Emend, 临床上主要用于治疗高致吐性抗肿瘤化疗药(包括大剂量顺铂治疗方案)所致的急性和迟发性恶心、呕吐^[2-4]。2013年9月, 原食品药品监督管理局批准进口阿瑞匹坦胶囊^[5]。为更好地控制阿瑞匹坦原料药的有关物质, 笔者根据阿瑞匹坦的合成工艺, 采用梯度洗脱高效液相色谱(HPLC)法, 重点对可能引入终产品阿瑞匹坦的合成工艺中起始原料及中间体进行了相关研究, 结果表明建立的方法灵敏快速、准确可靠, 可作为阿瑞匹坦原料药的有关物质检查方法。

1 材料

1.1 仪器

1200型HPLC仪, 包括四元泵、二极管阵列检测器(DAD)、Chemstation化学工作站(美国Agilent公司); XS105电子天平(德国Sartorius公司)。

1.2 药品与试剂

4-苄基-2-羟基-1,4-噁嗪-3-酮(起始原料I)精制品(批号:

* 主管药师。研究方向: 医院制剂。电话: 0633-8290922。E-mail: pharm_2012@126.com

S1-121011, 纯度: 99.4%)、(R)-1-[3,5-二(三氟甲基)苯基]乙基-1-醇(起始原料II)精制品(批号: S2-121012, 纯度: 99.6%)、吗啉手性醇(中间体I)精制品(批号: M1-121111, 纯度: 99.5%)、吗啉盐酸盐(中间体II)精制品(批号: M2-121112, 纯度: 99.6%)及阿瑞匹坦精制品(批号: RS-130201, 纯度: 99.7%)、阿瑞匹坦原料药(批号: H130302、H130303、H130304, 纯度: 均≥99.0%)均由河北大学药化实验室提供; 乙腈为色谱纯; 其余试剂均为分析纯; 水为纯化水。

起始原料、中间体及阿瑞匹坦的化学结构式见图1。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Merck C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5.0 μm); 流动相: 流动相A为0.2%磷酸溶液(用NaOH试液调pH至2.5), 流动相B为乙腈, 梯度洗脱, 流速: 1.0 ml/min; 检测波长: 215 nm; 进样量: 20 μl; 柱温: 室温。梯度洗脱程序见表1。

2.2 强降解试验

将样品(批号: H130302)在各苛刻试验条件(酸、碱、光照、高温、氧化)下进行破坏, 以进一步考察上述色谱条件对破坏降解产生的新杂质的检出情况及与主成分峰的分离情况, 方法及结果如下。

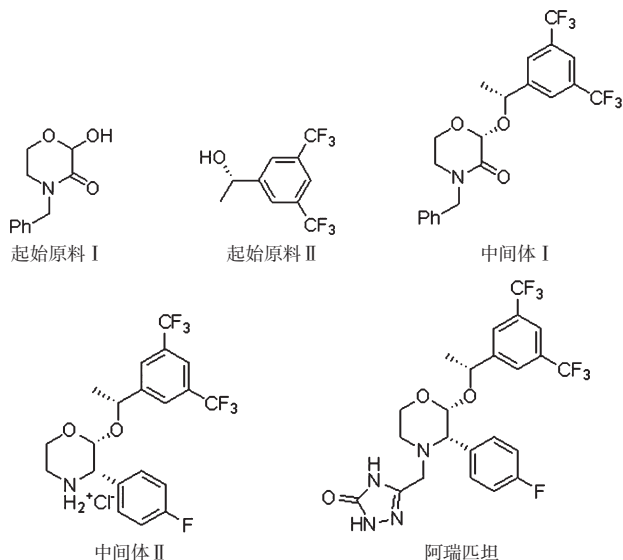


图1 起始原料、中间体及阿瑞匹坦的化学结构式

Fig 1 Chemical structure of starting material, intermediates and aprepitant

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 The program of gradient elution

时间, min	流动相A, %	流动相B, %
0	60	40
10	60	40
25	30	70
40	30	70

酸破坏样品制备:取本品约50 mg,置于100 ml量瓶中,加入1 mol/L HCl溶液0.5 ml,破坏12 h后加入等量的1 mol/L NaOH溶液中和,再加溶剂A[乙腈-0.2%磷酸(用NaOH试液调pH至7.0)(40:60)]溶解,并稀释至刻度,摇匀,即得。

碱破坏样品制备:取本品约50 mg,置于100 ml量瓶中,加入1 mol/L NaOH溶液0.5 ml,破坏12 h后加入等量的1 mol/L HCl溶液中和,再加溶剂A稀释至刻度,摇匀,即得。

光照破坏样品制备:取本品置于强光下(4 500 lx)照射24 h后,加溶剂A配制成0.5 mg/ml的溶液,即得。

高温破坏样品制备:取本品置于105 °C破坏24 h后,加溶剂A配制成0.5 mg/ml的溶液,即得。

氧化破坏样品制备:取本品约50 mg,置于100 ml量瓶中,加30%双氧水0.5 ml破坏12 h后,加溶剂A溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

同法平行制备空白样品。精密量取上述各破坏溶液20 μl,注入色谱仪,记录色谱图,结果见图2。

试验结果表明,本品在酸、碱、光照、高温、氧化破坏下均有降解产物产生,各新增降解产物与主峰均能达到较好分离。空白样品对杂质检出未见干扰。

2.3 工艺杂质研究

取合成工艺路线中主要起始原料、各步反应中间体及成品阿瑞匹坦适量,加溶剂A稀释成合适质量浓度的溶液,在上述色谱条件下依次进样记录色谱图,以进一步考察上述流动相条件,结果见图3及表2。

试验结果表明,起始原料、各步反应中间体与主成分阿瑞匹坦峰均能较好分离。

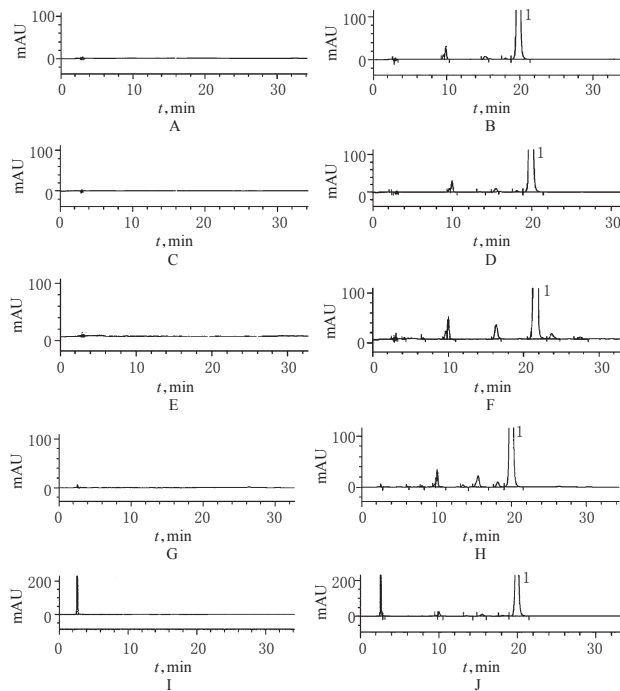


图2 强降解试验色谱图

A.酸空白样品;B.酸破坏后样品;C.碱空白样品;D.碱破坏后样品;E.高温空白样品;F.高温破坏后样品;G.光照空白样品;H.光照破坏后样品;I.氧化空白样品;J.氧化破坏后样品;1.阿瑞匹坦

Fig 2 Chromatograms of stressing test

A. blank sample destroyed by acid; B. sample destroyed by acid; C. blank sample destroyed by base; D. sample destroyed by base; E. blank sample destroyed by high temperature; F. sample destroyed by high temperature; G. blank sample destroyed by light; H. sample destroyed by light; I. blank sample destroyed by oxidation; J. sample destroyed by oxidation; 1. aprepitant

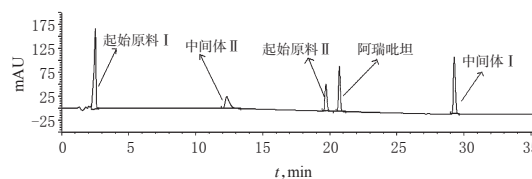


图3 起始原料、中间体及阿瑞匹坦混合溶液色谱图

Fig 3 Chromatograms of starting materials, intermediates and aprepitant mixed solution

表2 起始原料、中间体及阿瑞匹坦混合溶液试验色谱分析结果

Tab 2 Chromatogram analysis of results of starting materials, intermediates and aprepitant mixed solution

名称	保留时间, min	分离度	理论板数
起始原料 I	2.487		9 216
中间体 II	12.286	23.4	6 501
起始原料 II	19.696	16.7	8 131
阿瑞匹坦	20.701	4.0	11 432
中间体 I	29.273	33.8	18 149

2.4 方法学研究

2.4.1 线性试验。精密量取各杂质及阿瑞匹坦贮备液0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 ml,分别置于10 ml量瓶中,用溶剂A定容至刻度,摇匀,精密吸取各质量浓度梯度的标准溶液各20 μl,依

次进样,记录色谱图,以各质量浓度(c ,mg/ml)为横坐标、峰面积(A)为纵坐标,绘制标准曲线,结果见表3。

表3 线性关系结果

Tab 3 Results of linear relationship

名称	线性质量浓度范围,mg/ml	线性关系方程式	r	校正因子
起始原料 I	0.303~0.707	$A=610.5c+9.3$	0.999 0	2.08
起始原料 II	0.299~0.698	$A=231.76c+0.317 2$	0.999 4	0.79
中间体 I	0.300~0.699	$A=484.36c+10.165$	0.999 3	1.65
中间体 II	0.297~0.692	$A=202.4c+4.951 9$	0.999 1	0.69
阿瑞匹坦	0.295~0.688	$A=293.3c+0.549 1$	0.999 8	1.00

2.4.2 溶液的稳定性试验。取“2.4.1”项下质量浓度为0.5 mg/ml的溶液,作为供试品溶液,于室温下放置,在不同时间段(0、2、4、6、8 h)分别进样测定,测得起始原料 I、起始原料 II、中间体 I、中间体 II 及阿瑞匹坦峰面积的RSD分别为0.96%、0.84%、0.97%、0.78%、0.56%($n=5$),表明供试品溶液放置8 h内含量稳定。

2.4.3 阿瑞匹坦及杂质检测限试验。取起始原料 I、II,各步反应中间体 I、II 以及阿瑞匹坦用溶剂 A 分别逐级稀释,再精密量取各稀释液,照上述色谱条件依次进样20 μ l,记录色谱图。按信噪比3:1计算检测限,结果分别为0.01、0.06、0.01、0.25、0.03 μ g/ml。

2.4.4 重复性和精密密度试验。(1)重复性试验。取各杂质制成0.5 mg/ml溶液,平行制备6份,精密量取20 μ l进样,测定峰面积,测得起始原料 I、起始原料 II、中间体 I、中间体 II 含量的RSD分别为0.52%、0.46%、0.71%及0.67%($n=6$)。(2)中间精密密度试验。在不同时间由3个不同的分析人员按照重复性试验制备供试品溶液,每个分析人员配制2份溶液,分别用2台HPLC仪(Agilent1200、LC-20AD),按照上述色谱条件分别测定峰面积,测得起始原料 I、起始原料 II、中间体 I、中间体 II 峰含量的RSD分别为1.02%、1.14%、1.25%和1.14%($n=6$)。

2.4.5 回收率试验。分别精密量取各杂质品贮备液(质量浓度约为5.0 mg/ml)0.8、1.0、1.2 ml,分别置于10 ml量瓶中,用阿瑞匹坦贮备液(质量浓度为5.0 mg/ml)稀释至刻度,即平行制备低、中、高3个不同质量浓度供试品溶液各3份;分别取20 μ l进样,记录色谱图,计算回收率,结果见表4。

表4 各有关物质回收率结果($n=3$)

Tab 4 Results of recovery test of related substances($n=3$)

水平	杂质	加入量,mg	平均测得量,mg	平均回收率,%	RSD,%
低	起始原料 I	4.04	4.03	起始原料 I :99.43	起始原料 I :0.29
	起始原料 II	3.99	3.95	起始原料 II :99.05	起始原料 II :0.10
	中间体 I	3.99	3.92	中间体 I :98.85	中间体 I :0.64
	中间体 II	3.96	3.99	中间体 II :100.60	中间体 II :0.26
中	起始原料 I	5.05	5.01		
	起始原料 II	4.98	4.93		
	中间体 I	4.99	4.93		
	中间体 II	4.94	4.98		
高	起始原料 I	6.06	6.02		
	起始原料 II	5.98	5.93		
	中间体 I	5.99	5.96		
	中间体 II	5.93	5.95		

试验结果表明,该法测定起始原料 I、起始原料 II、中间体 I、中间体 II 4种杂质的回收率良好。

2.5 样品中有关物质测定

分别精密称取3批阿瑞匹坦原料药适量,加溶剂 A 溶解并

稀释制成每1 ml约含0.5 mg的溶液,作为供试品溶液;精密量取1 ml,置于100 ml量瓶中,用溶剂 A 稀释至刻度,摇匀,作为对照溶液;精密量取供试品溶液和对照溶液各20 μ l,分别注入液相色谱仪,记录色谱图,见图4;按照加校正因子的主成分自身对照法测定阿瑞匹坦原料药有关物质,3批样品测定结果见表5。

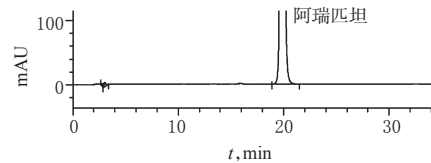


图4 样品的高效液相色谱图(批号:H130302)

Fig 4 HPLC chromatograms of the sample (batch No. H130302)

表5 样品中有关物质测定结果(%)

Tab 5 Determination results of the related substances in samples(%)

批号	起始原料 I	起始原料 II	中间体 I	中间体 II	其他杂质	总杂质
H130302	N/A	N/A	0.02	0.08	0.11	0.21
H130303	N/A	N/A	0.01	0.10	0.12	0.23
H130304	N/A	N/A	0.05	0.11	0.09	0.25

注:N/A表示未检出

note: N/A means not detected

3 讨论

3.1 检测波长的选择

经紫外分光光度计的扫描,本品在202.0、203.0、206.5、210.0 nm波长处均有吸收,而各杂质也均存在末端吸收。为有效检测出各杂质,选择检测波长为215 nm。

3.2 流动相的选择

参考相关文献^[6-8],经考察选择0.1%磷酸溶液及乙腈为流动相,将流动相的pH调至2.5进行流动相筛选。分别考察0.1%磷酸溶液与乙腈比例:条件1为40:60(V/V),条件2为50:50(V/V),条件3为60:40(V/V)。结果表明,在条件1下阿瑞匹坦理论板数较低,峰形较差;在条件2下阿瑞匹坦主峰容量因子在3~4左右,保留时间合适,但峰形较差、峰拖尾;在条件3下阿瑞匹坦峰形明显改善,理论板数明显增加,达到5 443,适合有关物质测定。

3.3 杂质的确定

4个已知杂质中4-苄基-2-羟基-1,4-噁嗪-3-酮与(R)-1-(3,5-二(三氟甲基)苯基)乙基-1-醇为合成的起始原料,而吗啉手性醇、吗啉盐酸盐为合成中间体,因此生产工艺中应严格控制这4种杂质。根据相关文献^[9-10]及2010年版《中国药典》方法^[11],本试验选用加校正因子的主成分自身对照法检测阿瑞匹坦原料药中的有关物质,方法准确、可靠,为该药提供了切实可行的质控方法。

参考文献

- [1] Massaro AM, Lenz KL. Aprepitant: a novel antiemetic for chemotherapy-induced nausea and vomiting[J]. *Ann Pharmacother*, 2005, 39(1):77.
- [2] Grunberg SM, Deuson RR, Mavros P, et al. Incidence of chemotherapy-induced nausea and emesis after modern antiemetics[J]. *Cancer*, 2004, 100(10):2 261.

气相色谱法测定左西孟旦原料药中6种有机溶剂残留量

孙晋瑞^{1,2*}, 伊星璐¹, 张昊然³, 刘宜辉¹, 任业明¹(1.山东省医药工业研究所, 济南 250101; 2.山东省化学药物重点实验室, 济南 250101; 3.济南大学医学与生命科学学院, 济南 250022)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)21-1995-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.21.25

摘要 目的: 建立测定左西孟旦原料药中6种有机溶剂即甲醇、乙醇、丙酮、二氯甲烷、异丙醇与二氧六环残留量的方法。方法: 采用气相色谱法。Agilent HP-5毛细管柱, (5%)苯基-(95%)甲基聚硅氧烷为固定液; 柱温采取程序升温; 氢火焰离子化检测器温度为250℃; 载气为高纯N₂; 进样口温度为200℃, 分流比为10:1; 采用顶空进样法测定, 顶空加热温度为100℃, 加热时间为40 min。结果: 甲醇、乙醇、丙酮、二氯甲烷、异丙醇与二氧六环的检测质量浓度线性范围分别为150.1~449.5 μg/ml($r=0.999\ 8$)、250.6~751.2 μg/ml($r=0.999\ 6$)、249.8~749.9 μg/ml($r=0.999\ 7$)、29.09~89.68 μg/ml($r=0.999\ 8$)、250.2~750.9 μg/ml($r=0.999\ 6$)、18.91~57.92 μg/ml($r=0.999\ 7$); 平均回收率为99.9%~100.0% (RSD=0.88%~1.11%, $n=3$); 定量限分别为0.12、0.18、0.33、0.21、0.45、0.99 ng。样品中只检出异丙醇。结论: 建立的方法快速简便, 结果准确可靠。

关键词 左西孟旦; 气相色谱法; 顶空进样; 有机溶剂; 残留量

Determination of 6 Residual Organic Solvents in Levosimendan Raw Material by GC

SUN Jin-rui^{1,2}, YI Xing-lu¹, ZHANG Hao-ran³, LIU Yi-hui¹, REN Ye-ming¹(1. Shandong Institute of Pharmaceutical Industry, Jinan 250101, China; 2. Shandong Provincial Key Laboratory of Chemical Drug, Jinan 250101, China; 3. School of Medicine and Life Science, Jinan University, Jinan 250022, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for the determination of 6 residual organic solvents as methanol, alcohol, acetone, dichloromethane, isopropanol and dioxane in levosimendan raw material. METHODS: Gas chromatography was used. Capillary column (5%) phenyl-(95%) methylpolysiloxane was used as fixation fluid by temperature programming; and the temperature of flame ionization detector was 250℃, and high purity N₂ was used as carrier gas. Inlet temperature was set at 200℃ with split ratio of 10:1. The conditions of headspace method included heating temperature of 100℃ and heating time of 40 min. RESULTS: The linear range of methanol, alcohol, acetone, dichloromethane, isopropanol and dioxane were 150.1-449.5 μg/ml($r=0.999\ 8$), 250.6-751.2 μg/ml($r=0.999\ 6$), 249.8-749.9 μg/ml($r=0.999\ 7$), 29.09-89.68 μg/ml($r=0.999\ 8$), 250.2-750.9 μg/ml($r=0.999\ 6$) and 18.91-57.92 μg/ml($r=0.999\ 7$), respectively; average recoveries were 99.9%-100.0% (RSD=0.88%-1.11%, $n=3$). The limits of quantification were 0.12, 0.18, 0.33, 0.21, 0.45 and 0.99 ng. Only the isopropanol was detected in samples. CONCLUSIONS: The established method is rapid, simple, accurate and reliable.

KEYWORDS Levosimendan; Gas chromatography; Headspace sampling; Organic solvents; Residual

- *****
- [3] Meenakshi G, Deepika T. Aprepitant: a novel drug to prevent cancer chemotherapy induced nausea and vomiting [J]. *JK Science*, 2010, 12(1): 46.
- [4] U.S. Food and Drug Administration. Aprepitant[EB/OL]. (2003-03-27) [2013-09-28]. <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm>.
- [5] 国家食品药品监督管理局. 阿瑞匹坦胶囊(进口药品)[EB/OL]. (2013-09-22) [2013-11-20]. <http://www.sfda.gov.cn/WS01/CL0001/>.
- [6] Benjamin T, Rajyalakshmi CH, Rambabu C. Stress degradation studies and validation method for quantification of aprepitant in formulations by using RP-HPLC[J]. *International Journal of ChemTech Research*, 2013, 5(4): 1 462.
- [7] Skrdla PJ, Abraham A, Wu Y. An HPLC chromatographic reactor approach for investigating the hydrolytic stability of a pharmaceutical compound[J]. *J Pharma Biomed Anal*, 2006, 41(3): 883.
- [8] Nama S, Chandu BR, Awen BZ. Development and validation of a new RP-HPLC method for the determination of aprepitant in solid dosage forms[J]. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2011, 10(4): 491.
- [9] 《化学药物杂质研究的技术指导原则》课题研究组. 化学药物杂质研究的技术指导原则[EB/OL]. (2007-08-23) [2013-12-07]. <http://www.cde.org.cn/zdyz.do?method=initValue&frameStr=0>.
- [10] 叶辉岩, 郑淑凤. HPLC法测定氯诺昔康片中有关物质的含量[J]. *中国药房*, 2013, 24(37): 3 537.
- [11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 二部[S]. 2010年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 附录 V D.

(收稿日期: 2013-10-11 修回日期: 2013-12-12)

* 副主任药师。研究方向: 新药研发。电话: 0531-81213291。E-mail: sjrcxl@126.com